

3 种泥鳅微卫星标记和 D-Loop 部分序列遗传变异分析

傅建军^{1,2}, 徐如卫³, 薛 婷¹, 杨福生⁴, 姜虎成¹, 李家乐^{1*}

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学食品科学与工程博士后流动站, 上海 201306;

3. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

4. 杭州萧山东海养殖有限责任公司, 浙江 杭州 311228)

摘要: 为进一步了解中国当前主要养殖鳅类种质资源现状, 实验采用 7 个微卫星标记和线粒体 D-Loop 部分序列, 对泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*, MA)、大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*, PD) 和台湾大泥鳅 (未见种属分类, TW) 3 种泥鳅进行群体遗传变异分析。结果显示, 6 个微卫星位点在 3 种泥鳅中均能获得有效扩增, 1 个微卫星标记 (*Mac239*) 只在 MA 中获得特异性扩增, 而在 PD 和 TW 中未能获得有效扩增条带。在 3 种泥鳅共 90 尾个体的 D-Loop 部分序列中发现 32 个单倍型, 仅在 PD 和 TW 间存在 1 个共享单倍型。实验中共检测到 65 个变异位点, 其中 MA 与 PD 和 TW 间存在 29 个特异性位点, 而 PD 和 TW 间未检测到特异性位点。瓶颈效应和中性检验显示, TW 近期可能发生有效群体数量的减少。基于微卫星标记和 D-Loop 部分序列的遗传变异分析显示, TW 和 PD 间的 Nei's 遗传距离和 K2P 遗传距离最近 (0.297 和 0.006), 明显小于两者与 MA 间的遗传距离 (1.011 ~ 1.899 和 0.095 ~ 0.099); 分子方差分析 (AMOVA) 显示, 3 种泥鳅的遗传分化极显著 ($P < 0.01$)。群体间遗传结构和单倍型网络分析显示, 3 种泥鳅的遗传结构相对独立, 仅在 TW 和 PD 间存在一定程度的遗传结构混杂。研究表明, 泥鳅和大鳞副泥鳅在遗传结构上存在明显差异, 可采用分子标记进行有效鉴别; 台湾大泥鳅可能是大鳞副泥鳅的生态种群或遗传改良群体, 而非有效物种。

关键词: 泥鳅; 大鳞副泥鳅; 微卫星; D-Loop 序列; 分子鉴定

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 是我国主要养殖鳅类, 分别隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鳅科 (Cobitidae) 泥鳅属 (*Misgurnus*) 和副泥鳅属 (*Paramisgurnus*), 其中泥鳅广泛分布于东亚大陆、中国台湾和日本, 而大鳞副泥鳅主要分布于我国长江流域和台湾地区^[1]。在日常生活中, 两者统称为泥鳅, 有“水中人参”的美誉, 其味道鲜美、营养价值高, 是我国重要的淡水经济鱼类。近些年, 受益于国内消费和出口日韩的市场需求, 泥鳅养殖效益相对较好, 各地的泥鳅养殖蓬勃发展, 尤其最新引进大陆的台湾大泥鳅, 更是成为热门养

殖对象。相对泥鳅和大鳞副泥鳅而言, 台湾大泥鳅在生长速度、抗病力和养殖成活率等方面具有明显优势, 但目前对其种属背景还缺乏统一认识。

泥鳅和大鳞副泥鳅具有较近的亲缘关系, 曾被归为同一属^[2]; 两者外形相似且存在分布区域重叠, 在养殖和流通过程中经常容易混淆, 尤其是苗种阶段^[3]。目前, 研究人员在染色体组型^[4]、群体遗传变异^[5]及物种鉴别^[3]等方面开展过对泥鳅和大鳞副泥鳅的比较分析。台湾大泥鳅成体除了个体规格相对大以外, 外形上与大鳞副泥鳅差异不大, 在幼苗阶段更是难于鉴别。分子标记作为鱼类种质资源研究的有效手段^[6], 被广泛用

收稿日期: 2014-10-29 修回日期: 2014-12-29

资助项目: 上海水产养殖工程技术研究中心资助 (13DZ2280500); 上海市知识服务平台 (ZF1206)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

于鱼类亲缘关系^[7]、群体多样性^[8]和遗传分化^[9]等研究,在鳅类遗传变异^[10]、系统发育^[11]和多倍体进化^[12]等研究中也应用。本研究分别用微卫星标记和线粒体 D-Loop 部分序列,对泥鳅、大鳞副泥鳅和台湾大泥鳅等 3 群体开展遗传变异分析,并对台湾大泥鳅的遗传背景进行初步探讨,为鳅类种质资源开发和利用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与 DNA 提取

2013 年 12 月至 2014 年 4 月,于浙江省杭州市和丽水市收集泥鳅群体(MA)和大鳞副泥鳅群体(PD),由台南乌头山购得台湾大泥鳅群体(TW)。3 个群体各取样 30 尾,剪鳍固定于无水乙醇中,4℃保存备用。基因组 DNA 采用苯酚/氯仿法提取^[13],通过 1% 琼脂糖胶检测完整性,经 NanoDrop 分光光度仪检测其纯度及浓度。DNA 样品被稀释至 20 ng/μL,于 -20℃保存备用。

1.2 分子标记扩增及检测

微卫星标记 PCR 扩增及检测 采用的 7 对微卫星引物来自于已公布的泥鳅微卫星引物(Mac15, Mac37, Mac49, Mac73, Mac133, Mac239, Mac391)^[14-15]。引物由上海生工生物工程有限公司合成,并在上游引物 5'端加 FAM 或 HEX 荧光标记。

微卫星标记 PCR 扩增体系为 25 μL,包括 10 × PCR Buffer 2.5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL、TaqDNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.5 μL、上游及下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL、基因组 DNA (20 ng/μL) 1 μL,补充无菌水 16.5 μL。所需试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。PCR 扩增程序为 94℃预变性 2 min; 94℃变性 30 s, 55℃复性 30 s, 72℃延伸 40 s, 扩增 35 个循环;最后再 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增反应在 Eppendorf 梯度 PCR 仪上完成。反应产物通过 ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪分析,以 GS500LIZ 为分子量内参,通过 Genemapper 3.5 软件读取微卫星扩增产物的分子量数据。

线粒体 D-Loop 部分序列扩增及检测 根据泥鳅和大鳞副泥鳅的 mtDNA 全序列(GenBank 序列号分别为 KC884745^[14]和 KJ027397)的 D-Loop 区相对保守区设计通用引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物和下游引物

序列分别为 PF: 5'-ATGTAGTAAGAGACCAC-CAA-3'; PR: 5'-ATGTGGTGGCATAAGTCAA-3'。

D-Loop 序列 PCR 扩增体系为 50 μL,为微卫星标记扩增体系的 2 倍;PCR 扩增程序参照上文微卫星标记扩增程序。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,由上海生工生物工程有限公司通过 ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪进行测序。

1.3 数据分析

微卫星标记分析 根据分子量数据确定个体各位点基因型,用 PopGene 3.2 软件^[16]计算等位基因数(N_a),有效等位基因数(N_e),观测杂合度(H_o),期望杂合度(H_e);用 Cervus 3.0 软件^[17]计算多态信息含量(PIC)。利用 Arlequin 3.5 软件^[18]计算群体遗传分化指数(F -statistics, F_{ST})及分子方差分析(AMOVA)。基于 PopGene 3.2 软件^[16]计算群体间的 Nei's 遗传距离,采用 MEGA 5.0 软件^[19]作 UPGMA 进化树。根据各位点等位基因频率,用 Bottleneck 3.4 软件^[20]进行瓶颈效应分析,基于 IAM(infinite allele model)模型,分析杂合度过剩情况,依此推测群体动态变化。基于不同理论群(K 值)假设,利用 Structure 2.3 软件^[21]构建群体遗传结构图。

D-Loop 部分序列分析 使用 BioEdit 7.0 软件^[22]进行序列编辑,并用 ClustalX 1.81 软件^[23]进行同源比对和长度确定。采用 DnaSP 5.0 软件^[24]统计多态性位点数(S)、单倍型个数(h)、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(π)和平均核苷酸差异数(K)等遗传多样性参数,并进行群体的 Tajima's D 值中性检验。利用 Arlequin 3.5 软件^[18]计算核苷酸组成统计、分子方差分析(AMOVA)和遗传分化指数(F -statistics, F_{ST})。利用 MEGA 5.1 软件^[19]计算群体间的 K2P 遗传距离,并构建 UPGMA 进化树。利用 Network 4.6 软件^[25]构建单倍型的 MJ 网络图。

2 结果

2.1 遗传变异特征及群体动态分析

各群体的等位基因数(N_a)为 8.333 ~ 12.000,有效等位基因数(N_e)为 3.950 ~ 7.079,平均观测杂合度(H_o)为 0.508 ~ 0.738,平均期望杂合度(H_e)为 0.678 ~ 0.764,平均多态信息含量(PIC)为 0.645 ~ 0.707(表 1)。其中,PD 和 TW 的遗传多样性水平相似,TW 稍高;相对而言,MA 的

等位基因数较多,但杂合度等遗传多样性指数较低。实验发现 1 对特异性微卫星标记位点 *Mac239* 仅在 MA 中获得特异性条带,而在 PD 和 TW 中没有相应的扩增条带(图 1)。

表 1 3 种泥鳅微卫星标记和 D-Loop 序列的遗传多态性参数				
Tab.1 Genetic diversity parameters of microsatellite markers and D-Loop sequences in three stocks of loach				
分子标记 molecular marker	多样性指数 diversity index	泥鳅 MA	大鳞副泥鳅 PD	台湾大泥鳅 TW
微卫星标记 microsatellite marker	等位基因数 N_a	12.000	8.333	8.833
	有效等位基因数 N_e	7.079	3.950	5.826
	观测杂合度 H_o	0.508	0.644	0.738
	期望杂合度 H_e	0.678	0.700	0.764
	多态信息含量 PI_C	0.645	0.650	0.707
	IAM 模型符号检验 P	0.526	0.544	0.036 *
D-Loop 序列 D-Loop sequence	多态性位点 S	26	9	9
	单倍型数 h	16	10	7
	单倍型多样性 H_d	0.929	0.743	0.768
	核苷酸多样性 π	0.007	0.003	0.005
	平均核苷酸差异数 K	3.657	1.331	2.340
	Tajima's D	-1.581	-1.676	0.009 4

注: * 表示显著性杂合度过剩($P < 0.05$)
Notes: * means significance for heterozygosity excess($P < 0.05$)

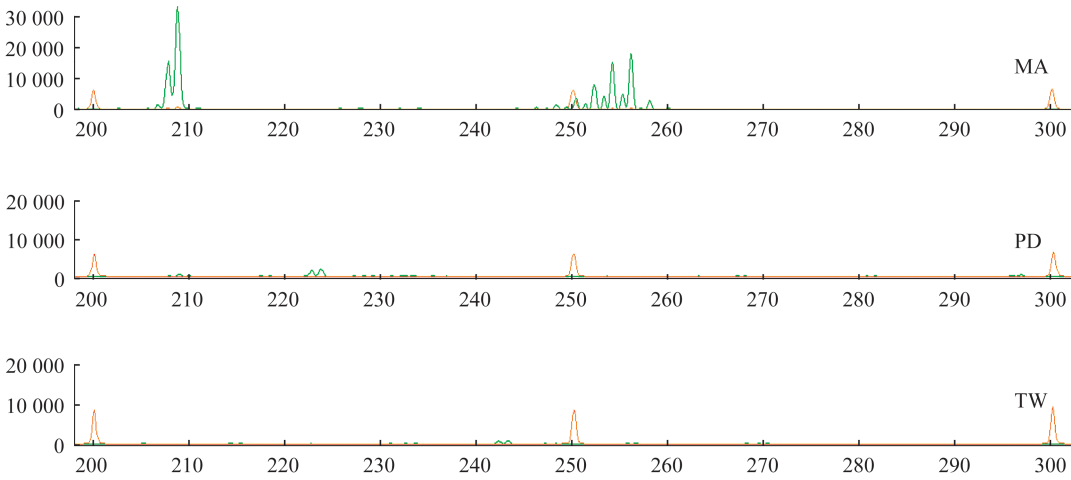


图 1 微卫星位点 (*Mac239*) 在 3 种泥鳅中的特异性扩增
Fig.1 The specific bands of microsatellite locus (*Mac239*) amplified in three stocks of loach

3 种泥鳅共计 90 尾个体的 D-Loop 区部分序列进行扩增,在 502 bp 的同源序列中发现 32 个单倍型,即 H_1 到 H_32 (GenBank 序列号依次为 KM609018-KM609049)。其中,H_1 到 H_16 为 MA 所特有,H_18 到 H_26 为 PD 所特有,H_27 到 H_32 为 TW 所特有;只有 H_17 是 PD 和 TW 所共享。包括 5 个插入/缺失变异位点在内,共检测到 65 个变异位点,其中有 29 个位点表现在 MA 与 PD 和 TW 之间的特异性变异(图 2)。在对 3 种泥鳅基于 D-Loop 部分序列的遗传多样性

比较发现,MA 的遗传多样性水平高于 PD 和 TW,而 PD 和 TW 的各项遗传多样性参数各有高低,整体水平相似(表 1)。
基于微卫星标记对 3 种泥鳅的瓶颈效应分析发现,TW 存在显著等位基因杂合度过剩($P < 0.05$)(表 1);基于 D-Loop 序列信息对 3 种泥鳅的中性检验显示,TW 的 Tajima's D 值为正值,MA 和 PD 的 Tajima's D 值为负值,均未显著偏离中性($P > 0.05$)(表 1)。以上分析表明 TW 近期可能发生瓶颈效应。

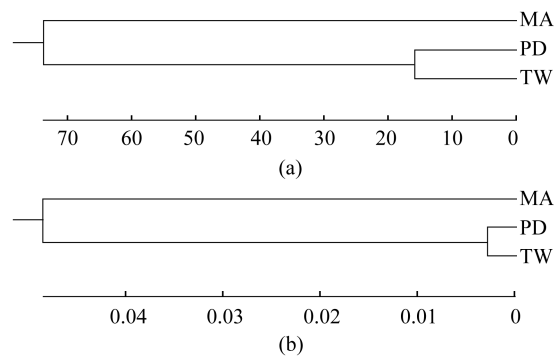


图 3 3 种泥鳅基于微卫星标记 (a) 和 D-Loop 序列 (b) 遗传变异的 UPGMA 树

Fig.3 The UPGMA trees among three stocks of loach based microsatellite markers (a) and D-Loop sequences (b)

对 3 种泥鳅进行分子遗传方差分析 (AMOVA), 基于微卫星标记变异的群体间方差组分占 19.32%, 遗传分化指数 F_{ST} 为 0.193 ($P < 0.01$) (表 3); 基于 D-Loop 序列变异, 群体间方差组分占 92.09%, 遗传分化指数 F_{ST} 为 0.921 ($P < 0.01$) (表 3)。

2.3 遗传结构及单倍型网络图

对比执行假设 K 值 (理论群) 为 2 和 3 的遗传结构拟合图 (图 4), MA 遗传结构最为一致, 明显独立于 PD 和 TW; PD 和 TW 间也具有相对独立的遗传结构, 但存在一定程度的混杂。

利用单倍型构建的 MJ 网络图 (图 5), 单倍型明显分为 2 个分支, 具有明显的群体特异性 (MA 所特有的单倍型 H_1 到 H_16 为一支, PD 和 TW 所有的单倍型 H_17 到 H_32 分为另一支)。

表 3 3 种泥鳅基于微卫星标记和 D-Loop 序列的分子方差分析 (AMOVA)

Tab.3 Analyses of molecular variances (AMOVA) of microsatellite markers and D-Loop sequences in three stocks of loach

分子标记 molecular marker	变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	百分率/% percentage	固定指数 fixation indices
微卫星标记 microsatellite marker	群体间 among populations	66.720	0.512	19.32	0.193 **
	群体内 within populations	382.618	2.137	80.68	
	总体 total	449.338	2.649		
D-Loop 序列 D-Loop sequence	群体间 among populations	855.644	14.220	92.09	0.921 **
	群体内 within populations	106.267	1.221	7.91	
	总体 total	961.911	15.442		

注: ** 表示达到极显著性水平 ($P < 0.01$)

Notes: ** means extreme significance ($P < 0.01$)

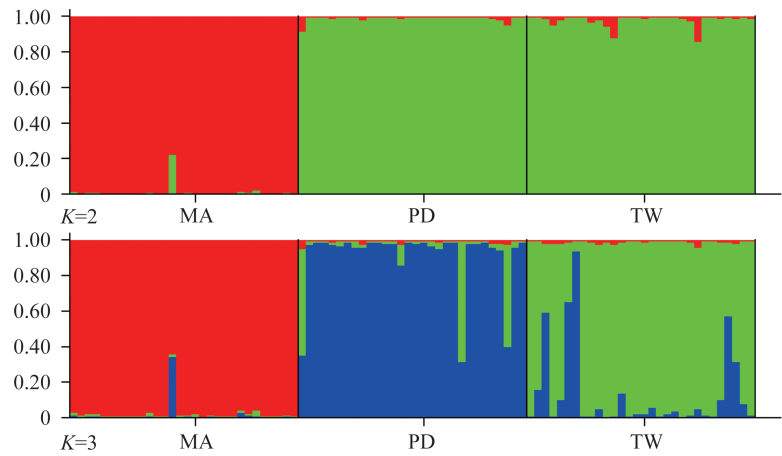


图 4 3 群体各个体在不同 K 值下的遗传结构图

Fig.4 Genetic structure assumed in different K values for individuals of three populations

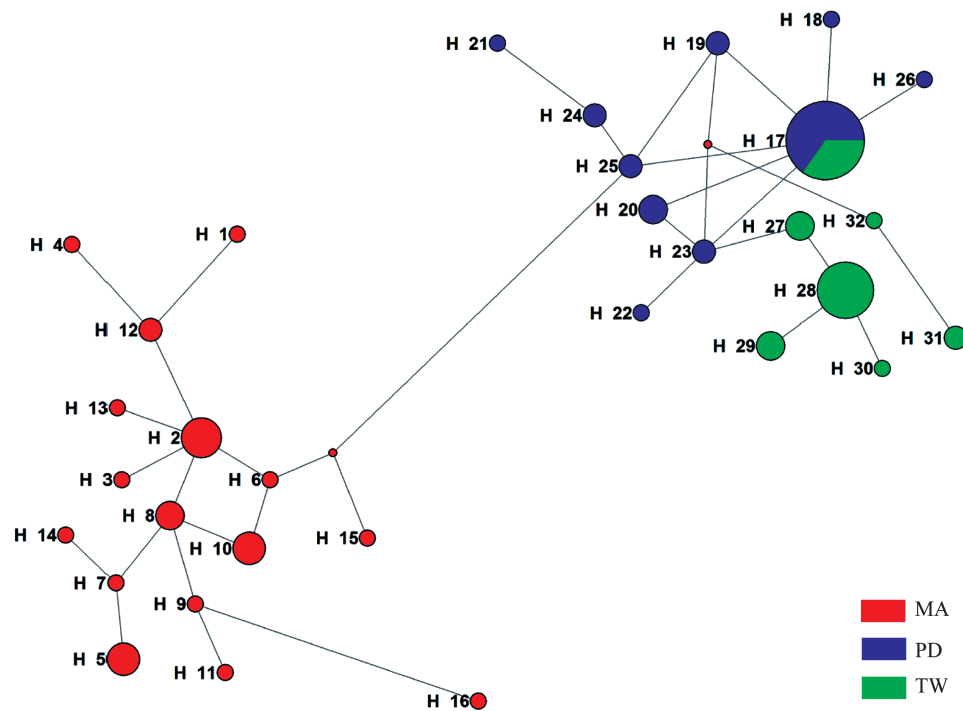


图 5 mtDNA D-Loop 区单倍型的网络结构图
Fig. 5 The haplotypes network of D-Loop partial sequence

3 讨论

3.1 特异性位点分析

微卫星标记在相近物种间具有一定的适用性,利用微卫星标记进行跨种扩增可为相近物种的群体遗传研究提供便捷,并可应用于鱼类种群鉴定^[26-27]。在鳅类研究中,陈钢铭等^[3]利用泥鳅微卫星标记在大鳞副泥鳅中获得有效扩增并发现 3 个特异性标记可用于鉴别 2 种泥鳅;You 等^[28]研究发现,1 个泥鳅微卫星标记可用于鉴定泥鳅和大鳞副泥鳅的杂交后代。本研究中,多数泥鳅微卫星标记能实现跨种扩增;而 *Mac239* 位点只在 MA 中获得特异性扩增条带,在 PD 和 TW 中均未获得有效扩增条带,这可为泥鳅的分子鉴定提供有效方法。研究表明,台湾大泥鳅与大鳞副泥鳅在核基因组水平具有更高遗传相似性。

目前,线粒体片段多态性被广泛用于水产动物分子鉴定研究,尤其是 DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术^[29]。线粒体控制区 (D-Loop 区) 为非编码区,缺乏编码的选择压力,比其他线粒体基因进化速率更快,被广泛应用于群体遗传变异及系统进化等研究^[11]。在鱼类物种鉴别方面, Baker 等^[30]利用线粒体控制区对市场上的鱼肉进

行过鉴别分析,唐文乔等^[31]曾利用线粒体控制区分析鱼类的物种有效性。本研究发现 D-Loop 序列存在较高频率的物种间特异性变异位点,MA 与其他 2 个群体 (PD 和 TW) 的单倍型间存在 29 个特异性位点,而 PD 和 TW 间未发现特异性位点。研究表明,台湾大泥鳅与大鳞副泥鳅在线粒体基因组水平具有更高相似性。

3.2 遗传多样性与群体动态分析

遗传多样性研究是生物多样性研究的重要内容,更是开展遗传育种研究的前提,而各种分子标记是遗传多样性研究的有效手段^[6]。本研究所呈现的较高遗传多样性指标,与李雅娟等^[32]对中国 3 种野生泥鳅的遗传多样性研究结果相似,明显高于曾柳根等^[33]对鄱阳湖区泥鳅的遗传多样性研究及游翠红等^[10]对 7 个大鳞副泥鳅群体的遗传多样性研究,推测以上不同研究结果存在较大差异与检测手段、样本量和样本来源等有关^[8]。遗传多样性为物种的适应能力、生存能力和进化潜力提供潜在的遗传基础^[34]。结合 D-Loop 序列变异分析,发现 MA 具有更高的遗传多样性水平,而 PD 和 TW 的遗传多样性相对较低。推测与泥鳅具有更强的环境适应能力有关,这由其更广泛的地理分布可以得到体现^[1];大鳞副泥

鳅分布区相对狭窄,台湾大泥鳅源自相对地理隔离的台湾岛,可能会导致两者遗传资源呈现相对的局限性。

当群体经历瓶颈效应时会表现出杂合度过剩现象,依此可以衡量有效群体数量下降的瞬间效应^[35]。基于微卫星标记的研究,发现只有 TW 呈显著的杂合度过剩,表明近期可能经历过瓶颈效应^[36]。在基于 D-Loop 序列变异对群体动态的中性检验也发现,仅有 TW 的 Tajima's *D* 值为正值,说明历史上未经历过群体扩张,可能面临瓶颈效应^[37]。结合以上分析,推测在对台湾大泥鳅的种质开发和利用过程中,可能受长期定向选择的影响,造成有效群体数量的减少,从而导致遗传瓶颈效应。

3.3 群体遗传变异分析

就群体遗传分化指数和 AMOVA 分析结果而言,本研究基于不同分子标记的分析结果均显示,3 种泥鳅间存在极显著的遗传分化。微卫星标记与 D-Loop 序列变异在 AMOVA 方差组分及遗传距离估算上表现出的不同,归因于两者遵循不同遗传模式而导致变异速率存在差异^[38]。就基于微卫星标记变异的 Nei's 遗传距离而言,张倩倩等^[27]研究发现,鳊鲂鱼类种属的遗传距离介于 0.560 6 ~ 1.759 2;傅建军等^[8]研究发现,我国草鱼野生群体间遗传距离介于 0.067 5 ~ 0.349 3。而在基于 D-Loop 序列变异的 K2P 遗传距离相关研究中,唐文乔等^[31]研究发现,短颌鲚 (*Coilia brachygnathus*)、湖鲚 (*C. nasustaihuensis*) 与刀鲚 (*C. nasus*) 间遗传距离较小(0.011 ~ 0.020),明显小于与其他类群间的遗传距离(0.051 ~ 0.349),依此认为前两者是刀鲚的淡水生态种群;姬南京等^[34]研究发现仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 地理群体间遗传距离介于 0.037 4 ~ 0.042 0;傅建军^[38]研究发现,我国草鱼野生群体间遗传距离更小(0.001 5 ~ 0.004 9)。对比以上的研究结果,本实验中 TW 和 PD 间 Nei's 遗传距离和 K2P 遗传距离较近(0.297 和 0.006),应属物种内遗传差异,明显小于两者与 MA 的遗传距离(1.011 ~ 1.899 和 0.095 ~ 0.099),因此推测台湾大泥鳅与大鳞副泥鳅应同属一个有效物种。

群体遗传结构是遗传变异在物种或群体中的一种非随机分布^[39]。相比傅建军等^[8]在草鱼地

理群体间的分析结果,本研究遗传结构的拟合结果更加清晰独立,说明 3 种泥鳅个体遗传差异较大,遗传结构相对独立。因此,在假设 *K* 值为 2 时,可视为是物种水平的遗传结构拟合;而假设 *K* 值为 3 时,可视为种群水平的遗传结构拟合,进一步解释了 PD 和 TW 间存在一定程度遗传混杂的现象。基于 D-Loop 序列单倍型网络图分析,发现单倍型分布具有明显的特异性分布,与遗传结构拟合图(*K* = 3)相符合。综上所述,推测台湾大泥鳅可能是大鳞副泥鳅的生态种群或遗传改良群体。

参考文献:

- [1] Ni Y, Wu H L. Fishes of Jiangsu Province [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 387 - 391. [倪勇, 伍汉霖. 江苏鱼类志. 北京: 中国农业出版社, 2006: 387 - 391.]
- [2] Chen J X, Zhu S Q. Phylogenetic relationships of the subfamilies in the loach family Cobitidae [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1984, 9(2): 201 - 208. [陈景星, 朱松泉. 鳅科鱼类亚科的划分及其宗系发生的相互关系. 动物分类学报, 1984, 9(2): 201 - 208.]
- [3] Chen G M, Wang W M, Cao X J. Development of microsatellite markers for identifying *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* in juvenile stage [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(6): 117 - 120. [陈钢铭, 王卫民, 曹小娟. 微卫星标记快速鉴别幼鱼阶段的泥鳅与大鳞副泥鳅. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 117 - 120.]
- [4] Li K, Li Y C, Zhou D. A comparative study of the karyotypes in two species of mud loaches [J]. Zoological Research, 1983, 4(1): 75 - 82. [李康, 李渝成, 周瞰. 两种泥鳅染色体组型的比较研究. 动物学研究, 1983, 4(1): 75 - 82.]
- [5] Chang Z J, Zhou R J, Yu Q X. Genetic variation of two loach species revealed by RAPD analysis [J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(1): 89 - 93. [常重杰, 周荣家, 余其兴. 两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析. 动物学报, 2001, 47(1): 89 - 93.]
- [6] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. Aquaculture, 2004, 238(1-4): 1 - 37.
- [7] Lu X, Wang H, Liu B, Xiang J, et al. An effective method for parentage determination of the clam (*Meretrix meretrix*) based on SSR and CO I markers [J]. Aquaculture, 2011, 318(1-2): 223 - 228.

- [8] Fu J J, Li J L, Shen Y B, *et al.* Genetic variation analysis of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellite markers[J]. *Hereditas*, 2013, 35 (2) : 192 – 201. [傅建军, 李家乐, 沈玉帮, 等. 草鱼野生群体遗传变异的微卫星分析. *遗传*, 2013, 35 (2) : 192 – 201.]
- [9] Lai R F, Zhang X J, Li Y H, *et al.* Comparison of mitochondrial genomes of the genus *Megalobrama* and their phylogenetic analysis [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38 (1) : 1 – 14. [赖瑞芳, 张秀杰, 李艳和, 等. 鲴属鱼类线粒体基因组的比较及其系统发育分析. *水产学报*, 2014, 38 (1) : 1 – 14.]
- [10] You C H, Tong J G, Yu X M. Microsatellite DNA analysis on genetic diversity of seven populations of *Paramisgurnus dabryanus* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33 (1) : 84 – 91. [游翠红, 童金苟, 俞小牧. 大鳞副泥鳅 7 个野生群体遗传变异的微卫星分析. *水生态学杂志*, 2012, 33 (1) : 84 – 91.]
- [11] Tang Q, Liu H, Mayden R, *et al.* Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 39 (2) : 347 – 357.
- [12] Zhou X, Yu Y, L Y, *et al.* Comparative analysis of mitochondrial genomes in distinct nuclear ploidy loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its implications for polyploidy evolution [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9 (3) : e92033.
- [13] Zhang W M. Handbook of modern molecular biology experiment [M]. Beijing: Science Press, 2007: 70 – 78. [张维铭. 现代分子生物学实验手册. 北京: 科学出版社, 2007: 70 – 78]
- [14] Morishima K, Nakayama I, Arail K. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Genetica*, 2001, 111 (1 – 3) : 59 – 69.
- [15] Morishima K, Nakayama I, Arail K. Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) [J]. *Genetica*, 2008, 132 (3) : 227 – 241.
- [16] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89 (3) : 583 – 590.
- [17] Kalinowski T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16 (5) : 1099 – 1106.
- [18] Exoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver3. 5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10 (3) : 564 – 567.
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10) : 2731 – 2739.
- [20] Maruyama T, Fuerst P A. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck [J]. *Genetics*, 1985, 111 (3) : 675 – 689.
- [21] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotypes data [J]. *Genetics*, 2000, 155 (2) : 945 – 959.
- [22] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1998, 41: 95 – 98.
- [23] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24) : 4876 – 4882.
- [24] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messenguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19 (18) : 2496 – 2597.
- [25] Network 4. 6. 1. 1 User Guide [OL] [2014 – 10 – 29]. www.fluxs-engineering.com
- [26] Yi S K, Gao Z X, Luo W, *et al.* Cross-species amplification of *Megalobrama amblycephala* EST-SSR in *M. pellegrini* and identification of their reciprocal hybrids [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37 (7) : 970 – 977. [易少奎, 高泽霞, 罗伟, 等. 团头鲂 EST-SSR 在厚颌鲂中的跨种扩增及杂交 F_1 的鉴定. *水产学报*, 2013, 37 (7) : 970 – 977.]
- [27] Zhang Q Q, Chen J, Jiang X Y, *et al.* Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of different *Parabramis* and *Megalobrama* populations with microsatellite [J]. *Journal of*

- Fisheries of China,2014,38(1):15-22. [张倩倩,陈杰,蒋霞云,等.不同鳊鲂鱼类群体微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析.水产学报,2014,38(1):15-22.]
- [28] You C, Yu X, Tong J. Detection of hybridization between two loach species (*Paramisgurnus dabryanus* and *Misgurnus anguillicaudatus*) in wild populations [J]. Environmental Biology of Fishes, 2009,86(1):65-71.
- [29] Zhang J, Hanner R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011,39(1):31-42.
- [30] Baker C S, Cipriano F, Palumbi S R. Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan [J]. Molecular Ecology, 1996,5(5):671-685.
- [31] Tang W Q, Hu X L, Yang J Q. Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasustaihuensis* based on sequence variation of complete mtDNA control region [J]. Biodiversity Science, 2007,15(3):224-231. [唐文乔,胡雪莲,杨金权.从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性.生物多样性,2007,15(3):224-231.]
- [32] Li Y J, Yu Z, Zhang M Z, et al. Genetic diversity in chinese loach species analyzed by microsatellite DNA markers [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010,41(12):75-79. [李雅娟,于卓,张明昭,等.我国三种野生泥鳅遗传多样性的微卫星分析.东北农业大学学报,2010,41(12):75-79.]
- [33] Zeng L G, Hong Y F, Wang J H, et al. Genetic diversity of loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*) from Poyang Lake determined by microsatellite DNA [J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2008,32(1):84-88. [曾柳根,甘云飞,王军花,等.鄱阳湖区泥鳅的微卫星 DNA 多态性分析.南昌大学学报:理科版,2008,32(1):84-88.]
- [34] Ji N J, Chang Y Q, Zhao C, et al. D-Loop sequences variation and phylogenetic analysis in three geographical populations of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014,38(4):476-481. [姬南京,常亚青,赵冲,等.3 个地理群体仿刺参 D-Loop 序列的变异及系统发生分析.水产学报,2014,38(4):476-481.]
- [35] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. Evolution, 1975,29(1):1-10.
- [36] Cornuet J M, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [J]. Genetics, 1996,144(4):2001-2014.
- [37] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. Genetics, 1989,123(3):585-595.
- [38] Fu J J. Genetic analysis of population variations and growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [傅建军.草鱼群体变异及生长性状的遗传分析.上海:上海海洋大学,2013.]
- [39] Harmrick J L, Loveless M D. Associations between the breeding system and the genetic structure of tropical tree populations [M]. Bock J, Linhart Y B. Evolutionary Ecology of Plants. Boulder: Westview Press, 1989:129-146.

Genetic analysis of three stocks of loach with microsatellite markers and D-Loop partial sequences

FU Jianjun^{1,2}, XU Ruwei³, XUE Ting¹, YANG Fusheng⁴, JIANG Hucheng¹, LI Jiale^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Postdoctoral Research Station of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

4. Hangzhou Xiaoshan East China Sea Farm Limited Liability Company, Hangzhou 311228, China)

Abstract: In order to increase the understanding of the genetic resources of main economic loach species in China, seven microsatellite markers and mitochondrial D-Loop partial sequences were used to analyse three stocks of loach species, consisting of pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*, MA), largescale loach (*Paramisgurnus dabryanus*, PD), and Taiwan large loach (Uncategorized, TW). The results showed that, six microsatellite markers were commonly amplified in three stocks, whereas, one microsatellite marker (*Mac239*) specifically amplified in MA but failed to obtain effective amplified bands in PD and TW. Thirty-two haplotypes of D-Loop partial sequence detected in ninety individuals from three stocks were analyzed in this study, and there was only one which shared between PD and TW. A total of sixty-five variable sites were detected, twenty-nine of which were specific sites between MA and the others. It would be recently decreased of effective population size in TW, according the bottleneck and neutral test results. Based on the genetic variation analyses using microsatellite markers and D-Loop partial sequence, the closest Nei's genetic distance and K2P distance were found between TW and PD (0.297, and 0.006, respectively), obviously less than the genetic distance between MA and others (1.011 – 1.899, and 0.095 – 0.099, respectively); and the analysis of molecular variance (AMOVA) showed that extremely significant genetic differentiation among three stocks were detected in the present study ($P < 0.01$). The results of genetic structure and haplotype network analysis suggested that relative genetic independence was showed among three stocks, whereas, similar genetic resources were only found in TW and PD. In conclusion, the distinct genetic differences in loach species would be effectively identified using molecular markers; and this paper speculated that Taiwan large loach might be the ecology stock or genetic improved population of *P. dabryanus*, but not effective taxonomy species.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; microsatellite markers; D-Loop sequences; genetic identification

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com